



Universidade Federal
de São João del-Rei

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

ANA THIENY SILVA CARDOSO PEREIRA

**O ESTADO DA ARTE NO USO DE MARCADORES PARA DIAGNÓSTICO NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

OURO BRANCO
2022

ANA THIENY SILVA CARDOSO PEREIRA

**O ESTADO DA ARTE NO USO DE MARCADORES PARA DIAGNÓSTICO NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del Rei, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Braga Rodrigues

**OURO BRANCO
2022**

ANA THIENY SILVA CARDOSO PEREIRA

**O ESTADO DA ARTE NO USO DE MARCADORES PARA DIAGNÓSTICO NA
DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del Rei, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco, 21 de dezembro de 2022.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Daniela Leite Fabrino (UFSJ)

Prof. Dr. José Augusto Zorel (UFSJ)

Profa. Dra. Isabel Cristina Braga Rodrigues
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar onipotente nesta caminhada e por fornecer saúde e disposição para a realização deste trabalho.

Ao meu pai e familiares, pelo carinho, apoio e incentivo.

À minha orientadora Profa. Isabel Cristina Braga Rodrigues, pela disposição, por todas suas contribuições, pela paciência e incentivo.

Aos amigos e colegas de graduação.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados)
APP	Proteína precursora amilóide
A β	β -amilóide
BNPT	Peptídeo natriurético cerebral tipo B da proteína N-terminal
CCL	Comprometimento cognitivo leve
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEG	Eletroencefalograma
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
LCR	Líquido Cefalorraquiano
MEEM	Miniexame do estado mental
NFT	Novelos neurofibrilares
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico)
RCM	Receptor colinérgico muscarínico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição)
RM	Ressonância magnética RM
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i> (Regiões Amplificadas a partir de Sequências Caracterizadas)
SNC	Sistema Nervoso Central
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i> (Repetições de Sequências Simples ou Microssatélites)
STS	<i>Sequence Tagged Sites</i> (Sítios de Sequências Alvo)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações cerebrais com a Doença de Alzheimer. Fonte: Adaptado de JIN, 2015 e GAMCHEOLOU KOREAN MEDICAL CLINIC, 2021.	13
Figura 2. Divergência de um neurônio normal e um acometido pela Doença de Alzheimer. Fonte: ALVES et al., 2022.....	13
Figura 3. Produção e liberação da acetilcolina. Fonte: Adaptado de PINTO, 2017.	15
Figura 4. Via Amiloigênica da Doença de Alzheimer. Fonte: RIBEIRO; SANTOS; SOUZA, 2021.	16
Figura 5. Atividade astrocitária. Fonte: Adaptada de Block e colaboradores (2007).	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Discussão sobre os marcadores apresentados no estudo.	24
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	METODOLOGIA.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	A doença de Alzheimer	12
3.2	Marcadores	17
3.3	Diagnóstico da Doença de Alzheimer (DA)	19
3.4	Uso de biomarcadores no diagnóstico da DA	21
3.4.1	Uso dos biomarcadores A β 42 e T-Tau/P-Tau	21
3.4.2	Marcadores inflamatórios	23
3.4.3	Uso da proteômica	23
4	DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO.....	26
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

A doença de Alzheimer é um dos tipos de demências mais comuns no mundo, cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, é caracterizada por se tratar de uma doença neurodegenerativa e seu diagnóstico atualmente se divide em três fases: a doença pré-clínica, o comprometimento cognitivo leve associado ao Alzheimer e a demência, sendo utilizados exames clínicos e necropsia para a detecção. Pelo aumento da população idosa, principais acometidos pelo Alzheimer, um campo de estudo que é promissor é o uso da biotecnologia no diagnóstico de doenças desta natureza, mais precisamente o uso de marcadores genéticos. Por isso, o presente trabalho visa trazer uma revisão bibliográfica do tipo integrativa sobre a utilização de marcadores e sua importância para a biotecnologia e seu avanço. De forma mais específica trazer informações sobre a utilização e aplicação de biomarcadores na doença de Alzheimer, mostrando a evolução do diagnóstico, como está atualmente e perspectivas futuras. Apesar de já existirem avanços importantes nas pesquisas em biomarcadores para o diagnóstico, estes ainda não são específicos e sensíveis, não possuindo reprodutibilidade para serem padronizados no sistema de saúde. Entretanto, tem-se perspectivas promissoras em marcadores da proteína Tau e Beta-amiloide, bem como o uso de marcadores inflamatórios e a proteômica.

Palavras-chave: Biomarcadores; Demência; Biotecnologia; Alzheimer; Prevenção; Diagnóstico; Prognóstico.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the most common types of dementia in the world, about 50 million people worldwide, it is characterized by being a neurodegenerative disease and its diagnosis is currently divided into three stages: preclinical disease, mild cognitive impairment associated with Alzheimer's and dementia, clinical examinations and necropsy being used for detection. Due to the increase in the elderly population, the main ones affected by Alzheimer's, a promising field of study is the use of biotechnology in the diagnosis of diseases of this nature, more precisely the use of genetic markers. Therefore, the present work aims to bring an integrative bibliographical review on the use of markers and their importance for biotechnology and its advancement. More specifically, bring information about the use and application of biomarkers in Alzheimer's disease, showing the evolution of the diagnosis, how it is currently and future prospects. Although there are already important advances in research on biomarkers for the diagnosis, these are still not specific and sensitive, not having reproducibility to be standardized in the health system. However, there are promising perspectives in Tau and Beta-amyloid protein markers, as well as the use of inflammatory markers and proteomics.

Keywords: Biomarkers; Dementia; Biotechnology; Alzheimer; Prevention; Diagnosis; Prognosis.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia se apresenta de diversas formas e com aplicações muito distintas, tornando difícil defini-la de apenas uma maneira, por isso pode ser tida como um conjunto de conhecimentos e métodos nos quais utilizam-se seres vivos como base ativa para a produção industrial (SCRIBRAN, 1985). Se torna um campo de estudo e de conhecimentos multidisciplinares devido às suas aplicações e cronologia, uma vez que data dos primórdios da civilização o uso de fermentações. O conhecimento e o interesse em biotecnologia foi aumentando ao longo dos séculos, trazendo diversas descobertas importantes, como o uso de marcadores genéticos, de enzimas e melhoramento de alimentos e produtos industriais no século XX (GIEHL, 2006).

Um dos grandes avanços da biotecnologia foi o aperfeiçoamento das técnicas em diagnósticos de doenças, como o uso dos marcadores genéticos, podendo ser usados para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, trata-se de marcadores que identificam traços genéticos específicos, sendo utilizadas inúmeras metodologias para identificá-los (COUTO et al., 2017).

Uma das doenças cujo diagnóstico vem sendo pesquisado é a doença de Alzheimer, por ser uma das causas mais comuns de demência em idosos e uma das doenças neurodegenerativas que mais afetam a população, cerca de 50 milhões de pessoas no mundo. A demência é uma síndrome que se caracteriza através da deterioração progressiva dos múltiplos domínios da cognição, como: memória, raciocínio, linguagem, habilidades sociais, os quais podem comprometer a autonomia do ser. Uma das principais causas de demência irreversível é a doença de Alzheimer, responsável por cerca de 7 a cada 10 casos no mundo. (GANDRA, 2022).

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita em 1907 pelo neuropatologista Alois Alzheimer, sendo qualificada como uma doença neurodegenerativa progressiva, causadora de diversos distúrbios cognitivos, principalmente pela perda de memória (ALVES et al., 2022). O envelhecimento da população devido à melhora na expectativa de vida acontece mundialmente, porém a idade avançada é um fator de risco importante para o desenvolvimento de demências como a DA. Existem estatísticas que mostram que terão cerca de 80 milhões de pacientes com DA no mundo no ano de 2050 (HERRERA et al., 2002).

Atualmente o diagnóstico da DA é tardio feito majoritariamente através de exames clínicos e comprovados por necropsia. Então, um dos grandes desafios para um diagnóstico diferencial ainda em estágio inicial é conseguir diferenciar o que é fruto das alterações cognitivas da senioridade e o que é patológico gerado através da evolução do adoecimento. Essa detecção precoce é fundamental, pois auxiliaria em um prognóstico mais positivo para o avanço da doença e, consequentemente, em melhoria de qualidade de vida para o portador e seus cuidadores (ÁVILA; MIOTTO, 2003).

O estudo para a detecção precoce da DA vem se norteando no uso de marcadores genéticos e de exames de imagens que auxiliem no diagnóstico da doença enquanto ainda não aconteceu a neurodegeneração em todo o cérebro. A necessidade é que se tenha um diagnóstico sensível e específico, passíveis de padronização que possam auxiliar também na prevenção dos avanços precoces da DA (DUBOIS et al., 2010).

Então, o avanço da biotecnologia para o domínio e uso de técnicas mais avançadas para detecção e diagnóstico de doenças é promissor também para um prognóstico da Doença de Alzheimer, uma vez que poderiam ser utilizados tratamentos que poderiam atrasar esse avanço e, também, contribuindo com marcadores genéticos especializados nas fisiopatologias da DA.

Em vista disto, este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão da literatura do tipo integrativa sobre o avanço na descoberta de biomarcadores e sua aplicabilidade, evolução e uso como critério de diagnóstico preventivo e avançado da Doença de Alzheimer.

2 METODOLOGIA

No presente trabalho a metodologia empregada para pesquisa bibliográfica foi do tipo integrativa, orientada pela pergunta: “Quais os avanços científicos em marcadores para diagnóstico de Alzheimer?”. O estudo tem um caráter retrospectivo, observando o que existe de relevante para o avanço científico no uso de marcadores para o diagnóstico da Alzheimer. A pesquisa foi realizada a partir das bases de dados *Pubmed*, *SciELO* e repositórios de universidades, usando os termos “Biomarcadores, Marcadores, Diagnóstico, DA e Alzheimer” em português e inglês.

Os critérios de inclusão foram avaliados de acordo com a relevância do biomarcador através da especificidade e sensibilidade destes para o diagnóstico da Alzheimer e se existiam resultados e testes que possibilitavam e viabilizavam a reprodutibilidade deste biomarcador.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A doença de Alzheimer

São chamadas doenças neurodegenerativas aquelas que causam a degradação dos neurônios de maneira irreversível, de forma que o sistema nervoso do indivíduo perde lentamente suas funções neurológicas (BOTTINO e MORENO, 2006).

A doença de Alzheimer é um tipo de doença neurodegenerativa, classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma patologia degenerativa cerebral com características neuropatológicas e neuroquímicas. É responsável pelo comprometimento do sistema nervoso central e, geralmente, se caracteriza pela perda de memória recente, mas em seu avanço demais sintomas são apresentados, como: alterações de humor, dificuldade de fazer atividades rotineiras, até a perda completa de personalidade e realidade (SMITH, 1999 e MATTOS; GARCES et. al. 2011).

Histopatologicamente, a DA é caracterizada pelas consistentes mortes neuronais e perdas sinápticas em regiões do cérebro que são responsáveis pelas funções cognitivas, como o hipocampo, córtex entorrinal e cerebral e estriado ventral. Ocorre um depósito de fibrilares amiloidais que estão localizados nas paredes dos vasos sanguíneos associados a diversas placas senis, bem como, o acúmulo de filamentos anormais de proteína Tau e formação de novos neurofibrilares, como esquematizado nas figuras 1 e 2 (SELKOE, 2001).

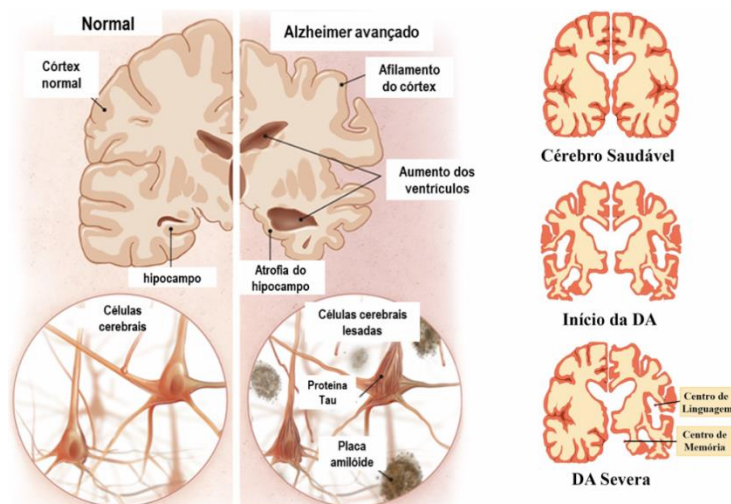


Figura 1. Alterações cerebrais com a Doença de Alzheimer. Fonte: Adaptado de JIN, 2015 e GAMCHEOULOU KOREAN MEDICAL CLINIC, 2021.

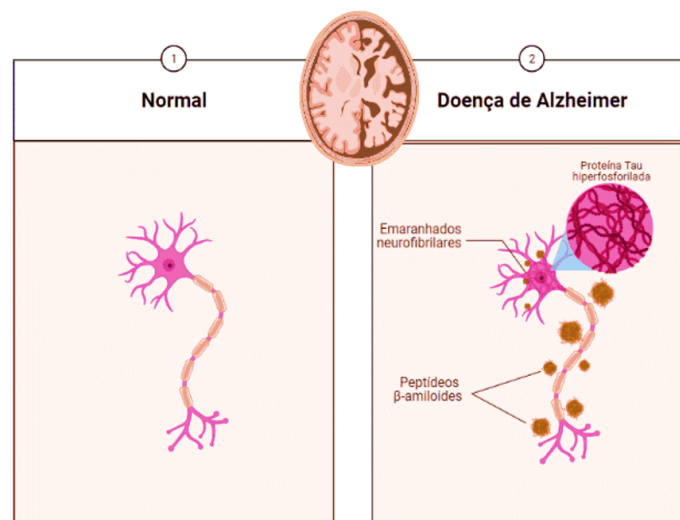


Figura 2. Divergência de um neurônio normal e um acometido pela Doença de Alzheimer. Fonte: ALVES et al., 2022.

Existem duas hipóteses para explicar a etiologia da DA. Uma delas é a cascata amiloida, na qual a neurodegeneração se inicia com a clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide (APP). Isto resulta na produção e deposição da proteína β -amilóide ($A\beta$) e na formação de placas senis (HARDY e SELKOE, 2002). A outra hipótese é a colinérgica, ou seja, a disfunção do sistema colinérgico, cujas alterações nos neurônios são estimuladas através da acetilcolina, produzindo as deficiências de memória e as falhas cognitivas (BARTUS; EMERICH, 1999).

Sobre a disfunção do sistema colinérgico foi observado em pacientes com DA, alterações na quantidade de receptores colinérgicos do tipo muscarínicos (RCMs). Estão presentes nos

neurônios pós-ganglionares do parassimpático e em alguns sítios simpáticos. Sendo responsáveis no sistema nervoso central (SNC) pelos controles de funções cognitivas, respostas emocionais e pelo sono. Por isso, na Doença de Alzheimer, essas alterações dos receptores causam falha no controle dessas funções do SNC (WESS, 1993).

A transmissão colinérgica se associa principalmente ao sistema nervoso parassimpático responsável pela normalização dos órgãos internos, a acetilCoA advinda da glicólise em conjunto com a colina captada no exterior da célula, formam a acetilcolina (ACh). Uma vez formada, é internalizada em vesículas e quando chega ao neurônio um potencial elétrico, ou seja, a informação advinda do SNC, acontece a abertura dos canais dependentes dos íons de cálcio, sendo liberados para as fendas sinápticas. Com essa entrada, ocorre a exocitose das vesículas, com a posterior liberação da ACh na fenda sináptica, fazendo com que esta interaja com os receptores, levando a estímulos excitatórios ou inibitórios. Se ocorre um excesso de ACh, acarreta a hiperestimulação da sinalização (PINTO, 2017). Essa via está representada na figura 3.

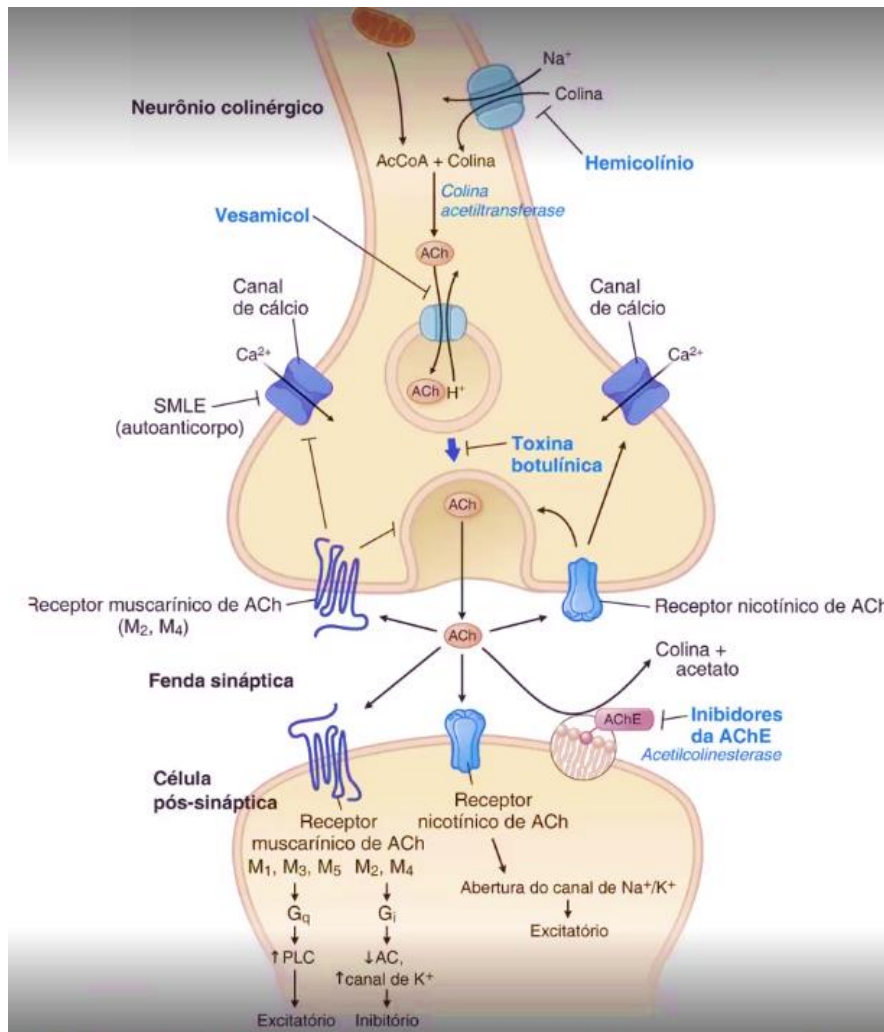


Figura 3. Produção e liberação da acetilcolina. Fonte: Adaptado de PINTO, 2017.

Além disso, há uma outra característica neuropatológica, a formação dos NFT, novos neurofibrilares, os quais são os filamentos helicoidais procedentes da hiperfosforilação da proteína Tau. Ou seja, ocorre a perda da função regular da proteína Tau, de estabilização dos microtúbulos neuronais, sendo substituída pelos NFTs, como mostrado na figura 4 (PARIHAR e HEMNANI, 2004).

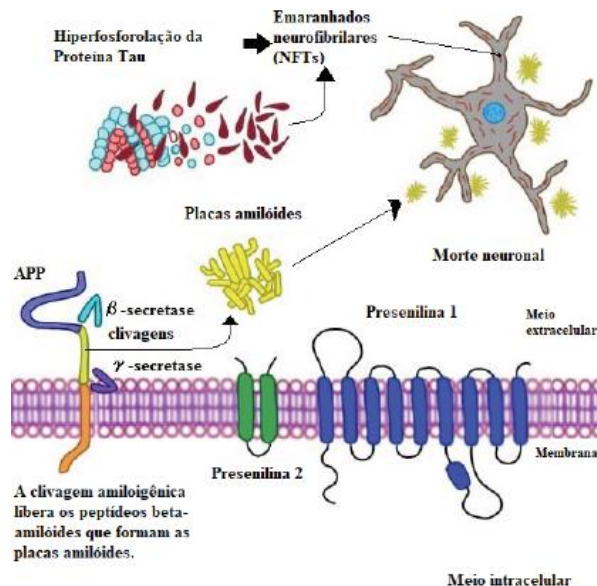


Figura 4. Via Amiloide da Doença de Alzheimer. Fonte: RIBEIRO; SANTOS; SOUZA, 2021.

A DA é um dos desafios da saúde posto que é crescente a quantidade da população de idosos mundialmente e por não existirem tratamentos eficientes. Além disso, sua descoberta, em geral, é tardia. Estima-se que em 2050 mais de 25% da população será idosa e, no Brasil, foi o grupo de idade que mais cresceu nas últimas duas décadas, sendo a idade avançada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo grave de demência. Portanto, a DA é também considerada um desafio social, sendo a sua prevalência aumentada com o avanço da idade, a qual atinge 10% da população entre 65 e 75 anos, e mais de 40% da população acima de 85 anos (GUTIERREZ; SILVA; GUIMARÃES e CAMPINO, 2014).

Além disso, pode ser considerada também como um desafio econômico e financeiro. Uma vez que o curso da doença varia entre 5 e 10 anos e reduz a expectativa de vida da pessoa, tornando-a dependente, tanto de cuidados excessivos de familiares, quanto de assistência profissional específica. O que faz com que aumente os custos no sistema de saúde e no sistema familiar do enfermo (SILVA e SIQUEIRA, 2017).

A hipótese é de que a doença se inicie décadas antes dos primeiros sintomas se manifestarem, o que faz com que os ensaios e testes também demorem anos para mapeamento dos sintomas e da progressão da doença. Por isso é necessário o desenvolvimento de diagnósticos eficientes que diminuam o tempo de detecção para início precoce do tratamento, tais como os biomarcadores (ALMEIDA et al., 2014).

3.2 Marcadores

Um dos marcos mais importantes da biotecnologia moderna foi a descoberta dos ácidos nucleicos por Watson e Crick em 1953, quando descobriram a estrutura de dupla-hélice e, posteriormente, a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), experimento executado por Kornberg em 1967. A técnica do DNA recombinante traz a criação artificial de novos organismos, de forma a se obter novas características através da hibridização da molécula de DNA (LIMA e MOTA, 2003). Então, essas descobertas sobre a natureza, composição química e as propriedades do DNA e genes geraram muitos avanços no uso das técnicas desenvolvidas pela biologia molecular, incluindo uma evolução considerável nas metodologias de diagnósticos de doenças.

Ao se tratar de DNA e do avanço da biologia molecular, temos a descoberta dos marcadores genéticos, os quais podem se diferenciar nos princípios, nas aplicações e até na metodologia adotada, sempre levando em consideração a finalidade e o objetivo que se tem. Podendo ser divididos em morfológicos, marcadores bioquímicos e moleculares (GROVER e SHARMA, 2016).

Os marcadores genéticos são definidos por seu caráter visível ou fenótipo analisável em que os alelos em *loci* segregam de forma Mendeliana e são qualificados por apresentarem um certo tipo de variabilidade (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os marcadores morfológicos são assim denominados pois se baseiam em variabilidade das características qualitativas, como cores e formatos, e sofrem influências ambientais, portanto, não contemplam a totalidade de características que podem afetar um metabolismo (AHMAD et al., 2017).

Os marcadores moleculares são aqueles que identificam traços genéticos específicos, sendo identificados por inúmeras metodologias desenvolvidas pela biologia molecular, tais como sequenciamento de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e detecção de micro arranjos de ácidos nucleicos. São assim classificados pois a variabilidade surge através de uma mutação genética (COUTO et al., 2017).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida em 1980, trouxe diversos avanços no campo da genética, para que análises mais rápidas e em muitos indivíduos pudessem ser realizadas. É uma técnica que se baseia na síntese *in vitro* de cópias de um segmento específico do DNA através da ação da enzima DNA polimerase, com a qual é possível analisar a variabilidade populacional através do uso de marcadores moleculares (CAVERS et al., 2005; SAADAOUI et al., 2017).

Logo, qualquer característica presente no DNA que pode diferenciar dois ou até mais indivíduos é denominada de marcador molecular, essas marcas acontecem através de alterações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA, que são chamadas de polimorfismos (DIAS-SALMAN et al., 2009).

Os polimorfismos genéticos são variações genéticas que ocorrem em sequências de DNA que são codificadoras e não-codificadoras, cuja consequência são alterações qualitativas ou quantitativas das proteínas (LIMA et al., 2006). Portanto, a detecção de polimorfismos, é interessante para diversas áreas de conhecimento e podem auxiliar na compreensão de bases moleculares através de variados aspectos biológicos (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Mediante a metodologia e o polimorfismo que se quer identificar é possível classificar os marcadores moleculares em dois grupos: obtidos através da amplificação do DNA ou por meio da hibridização (OLIVEIRA, 2021). Os marcadores obtidos por amplificação contemplam RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). Já para os obtidos por hibridização estão os conhecidos como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os minissatélites (CHIES et al., 2014).

Outra maneira de classificação dos marcadores moleculares é de acordo com a herança alélica de codominantes e dominantes. Sendo os dominantes capazes de identificar a presença ou ausência de um alelo especificamente e os codominantes proporcionam a distinção de seres hetero ou homozigotos (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Os marcadores bioquímicos, são assim classificados devido ao uso de indicadores biológicos para identificação da variabilidade, geralmente como consequência da interação do agente bioquímico com o organismo. Então, podem ser qualquer substância ou produto de uma

transformação bioquímica, que seja possível avaliar a condição metabólica e também que seja possível sua quantificação, por isso são muito utilizados em diagnósticos. Por serem indicadores biológicos, podem ser fisiológicos, físicos, histológicos, células específicas, genes, enzimas, hormônios e/ou outras moléculas (EISENBERG e KOIFMAN, 2001).

Desse modo, de acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulamentador de alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e produtos derivados do sangue humano, dos Estados Unidos da América, a classificação dos biomarcadores dependerá do parâmetro ou método utilizado, podendo ser:

- 1- Molecular: quantificação ou avaliação qualitativa da presença de determinada molécula;
- 2- Histológico: alterações celulares e teciduais identificadas através de microscopia;
- 3- Radiográfico: interações de sinais físicos com estruturas do organismo;
- 4- Fisiológico: avaliação de processos fisiológicos;
- 5- Cognitivo: avaliação das funções cognitivas.

3.3 Diagnóstico da Doença de Alzheimer (DA)

Atualmente a DA pode ser diagnosticada em três diferentes fases:

1. Pré-clínica;
2. Comprometimento cognitivo leve (CCL) devido à DA;
3. Demência.

Portanto, pode ser detectada de forma mais precoce, não sendo restrita à fase da demência, como acontecia nas metodologias de diagnóstico anteriores (FROTA et al., 2011).

O diagnóstico da DA pré-clínica é restringido apenas à pesquisa, no qual observa-se a presença de alterações nos exames representados pela atrofia cerebral na Ressonância Magnética (RM) e Tomografias por Emissão de Pósitrons (PET), bem como o uso de biomarcadores, os quais podem sinalizar alterações fisiopatológicas em pessoas ainda assintomáticas (DUBOIS et al., 2010).

O CCL é diagnosticado através da anamnese, porém não é restrito à clínica. Podem também ser utilizados biomarcadores para auxiliar no descobrimento da probabilidade do avanço da DA, dessa forma também atuando como prevenção do avanço doença. Os biomarcadores ainda

não são utilizados rotineiramente pois ainda não são padronizados e as análises são de alto custo, permanecendo neste mesmo patamar em 2022 (FROTA et al., 2011).

O diagnóstico da demência é realizado a partir de critérios clínicos padronizados, como os do *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association - NINCDS-ADRDA* e do *Diagnostic and Statistic Manual – DSM III-R, DSM IV*, os critérios são preenchidos através de anamnese, exames e avaliações cognitivas. Os critérios clínicos da *NINCDS-ADRDA* fazem a classificação da doença em provável, possível ou definitiva. Estabelecem que o diagnóstico deve ser feito através de exames clínicos, documentado por testes objetivos como minixame do estado mental (MEEM), tendo a confirmação pela avaliação neuropsicológica (MCKHAN et al., 1984).

A DA provável precisa ter um déficit em duas ou mais áreas da cognição, uma perda progressiva de memória e de outras funções cognitivas, bem como não possuir outras doenças cerebrais suscetíveis a causar déficits progressivos de memória e cognitivos. Já a possível tem início da doença comprovada através da DA provável e somada com a piora perceptível no quadro neurológico. Por fim, a definitiva é confirmada através de evidências histopatológicas a partir de biópsia ou necropsia (MCKHAN et al., 1984).

O MEEM é um teste objetivo que consiste em muitas questões agrupadas em sete categorias, com a pontuação máxima de 30. É muito usado na primeira etapa do rastreamento da demência e sofre variações de acordo com o nível de escolaridade do paciente e sua acurácia irá depender do ponto de corte utilizado (APOLINÁRIO et al., 2011).

Já os critérios para a *DSM* nas versões III e IV de DA envolvem o desenvolvimento de múltiplos déficits cognitivos manifestados por comprometimento da memória ou por uma ou mais perturbações cognitivas, as quais são (APOLINÁRIO et al., 2011):

- Afasia: perturbação da linguagem;
- Apraxia: capacidade prejudicada em execução das atividades motoras, mesmo possuindo um funcionamento motor intacto;
- Agnosia: sem capacidade de reconhecer ou identificar objetos;

- Perturbação do funcionamento executivo: impossibilitada de planejar, organizar e sequenciar

Contudo, alguns outros exames complementares podem ser usados para que um diagnóstico mais completo seja obtido, como: exames de sangue para medição de hormônio tireoestimulante (TSH) e nível sérico de vitamina B12; neuroimagem molecular e funcional e a neuroimagem estrutural para afastar outras causas de demência e mostrar atrofias cerebrais, exame do líquido cefalorraquiano (LCR) para identificação de causas específicas de demência como inflamações do Sistema Nervoso Central e doenças neoplásicas e inflamatórias; eletroencefalograma (EEG) para entendimento do nível de atividade elétrica cerebral e, até mesmo, estudos genéticos (CARAMELLI et al., 2011).

3.4 Uso de biomarcadores no diagnóstico da DA

Existem diversos trabalhos sendo publicados na última década mostrando a importância de um diagnóstico precoce da DA. Com isso, várias pesquisas provam o papel da proteína Beta-amiloide como um possível biomarcador, bem como a proteína Tau devido aos papéis que desempenham no organismo com o avanço da doença (GALASKO et al., 1995; KURZ et al., 1998; SJOGREN et al., 2001; ITOH et al., 2001; BLENNOW; ZETTERBERG, 2009).

Sendo a proteína Tau uma proteína do tipo intracelular, geralmente a quantidade encontrada no LCR é baixa. Entretanto, na DA por se tratar de um lento processo neurodegenerativo, o qual leva a uma crescente perda neuronal, pode ocorrer níveis aumentados de proteína Tau. Porém nem sempre níveis elevados de Tau são associados exclusivamente a DA, uma vez que outras doenças podem apresentar essa mesma manifestação (DEMARIN et al., 2011).

3.4.1 Uso dos biomarcadores A β 42 e T-Tau/P-Tau

A A β 42 é o principal peptídeo que está envolvido à formação de placas senis, primeiramente formando um núcleo de agregados de fibrilas de A β 42 e depois uma deposição de novas fibrilas neste núcleo, o que causa neuroinflamação e atividade astrocitária devido à perpetuação de neurotoxicidade, causada pela captação de glutamato (Figura 5) (ANDREASEN et al., 1999).



Figura 5. Atividade astrocitária. Fonte: Adaptada de Block e colaboradores (2007).

Sendo os NFTs estruturas localizadas dentro dos neurônios, os quais são compostos pelos filamentos helicoidais pareados (PHFs), formados pelas proteínas ubiquitina e P-Tau. (GOEDERT; CROWTHER; GARNER, 1991). Então, foi sugerida uma hipótese de que a elevação da proteína P-Tau no LCR de pacientes com Alzheimer seria indicativa da patologia nestes pacientes (GALASKO et al., 1995).

Galasko et al. (1995) demonstraram que os níveis de proteína Tau são elevados no LCR de pessoas já na primeira fase da DA. No entanto, a quantificação de T-Tau, ou seja quantidade de proteína Tau total é um teste inespecífico por ser inespecífico ao Alzheimer. Ishiguro et al. (1999) desenvolveram um método para detecção de P-Tau separadamente, uma vez que é possível medir a quantidade de proteína fosforilada, indicativo específico do Alzheimer. Então, outros estudos conseguiram demonstrar que a P-Tau é mais específica para o diagnóstico (KURZ et al., 1998; VANMECHELEN et al., 2000; BLENNOW et al., 2006).

Diversos imunoensaios já foram desenvolvidos para a detecção da P-Tau, para diferentes sítios de fosforilação através do LCR, pois a fosforilação da Tau *in vitro* ocorre pela ação de quinases dirigidas aos seus sítios de serina e/ou treonina (WANG et al., 2012). Ao sítio de serina 199 (fosfotau-Ser 199) foi descoberto que possui especificidade de 85% entre as outras demências (SJOGREN et al., 2001). Já ao sítio da treonina 181 descobriram que a P-Tau é elevada para DA (ITOH et al., 2001). Em estudo posterior foi observado que as concentrações de P-tau181 foram elevadas em pacientes patologicamente e clinicamente diagnosticados com Alzheimer (BRICKMAN et al., 2020).

Mattsson et al.(2009) avaliaram as proteínas A β 42 e T-Tau/P-Tau no LCR na prevenção do desenvolvimento de DA em pacientes que já se encontravam em CCL, mostrando que pacientes

que desenvolveram a DA apresentaram menor índice de A β 42 e maiores níveis de T-Tau e P-Tau dos que não desenvolveram a DA. O mesmo perfil foi apresentado por Sunderland et al. (2003) e por Ibach et al. (2006) ao usarem o método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), verificando especificidade de 80% e obtendo a conclusão de que estes biomarcadores podem auxiliar na prevenção da progressão da Doença de Alzheimer.

Existem estudos recentes em PET mostrando que os padrões espaciais de ligação da proteína Tau estão muito ligados aos padrões de neurodegeneração e as manifestações clínicas dos pacientes com DA (BEJANIN et al., 2017; OKAMURA; YANAI, 2017). Foi observado também que as lesões na proteína Tau ocorrem antes da deposição de A β (JOHNSON et al., 2015).

3.4.2 Marcadores inflamatórios

A presença de autoanticorpos na DA traz novas perspectivas de marcadores por estarem tanto no sangue quanto no LCR, porém ainda não se sabe em termos patológicos quais os papéis desempenhados por esses mediadores inflamatórios. O certo é que as pesquisas nessa área são crescentes, podendo apresentar potencial de detecção e de monitoramento (GIUNTA et al., 2008; COLASANTI et al., 2010; DEMARSHALL et al., 2016).

Por ocorrer um processo de neuro inflamação na DA, acontece a liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e fatores de complemento. Em uma tese demonstrada por Giunta et al. (2008) os autores comprovaram que a IFN-gama e outras citocinas pró-inflamatórias que interagem com o processamento e a produção de A β , podem ser utilizadas como marcadores de prevenção do avanço da doença.

Em estudo para verificar a viabilidade do uso de autoanticorpos para seu uso na prevenção na progressão da DA, foram obtidos resultados através de microarranjos, utilizando um painel de autoanticorpos individuais através do soro humano, o qual foi possível ter a distinção de portadores de CCL associados a DA com precisão de 100%, comparando-se com controles através *software* (DEMARSHALL et al., 2016).

3.4.3 Uso da proteômica

O uso da proteômica vem sendo utilizado devido à grande ascensão da bioinformática. Além disso, a dificuldade do diagnóstico através de biomarcadores do LCR também se tornou um

incentivador no uso da proteômica através de outros métodos como o plasma sanguíneo, uma vez que é necessária a realização da punção lombar no LCR, a qual pode ser considerada como uma prática invasiva (SCHNEIDER et al., 2009).

Ray et al. (2007) encontraram um perfil de 18 proteínas plasmáticas sinalizadoras endócrinas e que se assemelham a hormônios, que podem ser utilizadas para identificação de pacientes com CCL que tiveram a progressão para DA de 2 a 6 anos depois. A análise dessas proteínas mostrou uma desregulação sistêmica da hematopoiese, respostas imunes e suporte neuronal. Em pesquisa posterior do grupo foi descoberto que essas proteínas estão associadas aos níveis de Beta-amilóide ou Tau no LCR.

Já Soares et al. (2012) conseguiram determinar um imunoensaio para identificação de biomarcadores plasmáticos usando 190 analitos através do painel de perfil multianalito *Human DiscoveryMAP versão 1.0*, no qual relataram níveis aumentados do polipeptídeo pancreático e peptídeo natriurético cerebral tipo B da proteína N-terminal (BNPT) em pacientes com CCL e com DA.

4 DISCUSSÃO

Dentre as informações e os marcadores apresentados durante este estudo, segue na Tabela 1 as principais discussões sobre cada um deles.

MARCADOR	OBTENÇÃO	DISCUSSÃO
Beta-amiloide 42	LCR/Fluídos e plasma	Sozinho é inespecífico para determinação do Alzheimer. Especificidade de 80%. Custos elevados.
T-Tau	LCR/Fluídos e plasma	Aumento da proteína total ainda na primeira fase pré-clínica mas sozinho é inespecífico para determinar o Alzheimer. Custos elevados.
P-Tau	LCR/Fluídos e plasma	Grau de fosforilação da Tau varia em diferentes condições clínicas. Sensibilidade e especificidade de 80 a 90% para DA. Custos elevados.

P-Tau Serina 199	LCR	Especificidade de 85% em relação a outras demências. Custos elevados.
P-Tau Treonina 181	LCR	Grau de fosforilação diferente entre doenças. No sítio Treonina 181 foi observado sensibilidade aumentada para o Alzheimer, entre 80 a 95% em estudos em diferenciais de demência. Custos elevados.
IFN-Gama e citocinas	Plasma	Hipótese de que a inflamação pode ser o início para a progressão da DA. Prognóstico para a doença e auxílio na progressão com tratamentos específicos.
Autoanticorpos individuais	Microarranjos, Plasma	Precisão de 100% ao comparar com controles através de software. Sem estudos clínicos avançados.
Proteínas plasmáticas	Plasma	A análise dessas proteínas mostrou uma desregulação sistêmica da hematopoiese, respostas imunes e suporte neuronal, são associadas ao nível das proteínas Beta-amiloide e Tau. Sem mais estudos avançados.
Biomarcadores plasmáticos	Plasma	Níveis aumentados de BNPT em pacientes com CCL e com DA. Sem mais estudos avançados.

Tabela 1. Discussão sobre os marcadores apresentados no estudo.

Embora haja avanço nas pesquisas, na quantidade e na qualidade do uso de marcadores para o diagnóstico da Doença de Alzheimer, ainda não é uma realidade o seu uso de forma efetiva em pacientes. Pelas informações levantadas e apresentadas neste trabalho, é possível perceber que ainda não existe padronização no uso de marcadores para o diagnóstico, uma vez que é necessário que estes marcadores sejam específicos para DA e que também seja possível a reprodutibilidade, além disso para efetiva implementação dos testes é importante a redução de

custos dos mesmos, bem como o uso de marcadores que não sejam invasivos aos pacientes como os testes de LCR.

Tem-se a necessidade de pesquisas mais direcionadas e focadas em apresentar um padrão de sensibilidade e de reprodutibilidade para o diagnóstico. A expectativa é que alcançando estes objetivos, o uso de marcadores possa ser refletido no diagnóstico precoce da DA levando a prevenções da progressão da doença e, além disso auxiliar no diagnóstico diferencial na fase pré-clínica.

5 CONCLUSÃO

Este estudo trouxe a contribuição do estado da arte no diagnóstico da Doença de Alzheimer na visão da Biotecnologia e para a Engenharia de Bioprocessos. Logo, mesmo existindo uma variedade dos marcadores que podem vir a ser utilizados para o diagnóstico da Doença de Alzheimer, ainda é necessária a busca por marcadores eficientes que auxiliem o diagnóstico precoce da doença, sendo promissor possuir um foco para progredir em marcadores que já estudados e também no entendimento fisiopatológico do Alzheimer.

Apesar de muitos estudos já existirem no tema, os artigos mais relevantes em relação a detecção precoce do Alzheimer são datados da década passada. É evidente que se tem um avanço no tema, como o uso de métodos combinados: biomarcadores em adição aos exames de imagens ou até mesmo o uso de métodos menos invasivos que o LCR, exemplo do uso de biomarcadores no plasma sanguíneo ou até em mucosas, porém ainda não foram apresentados resultados na literatura que sejam reprodutíveis. Portanto, o diagnóstico permanece através dos exames clínicos e alguns testes adicionais como exames de imagem e sanguíneos (dosagens hormonais e de vitaminas).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F., et al. Molecular Markers and Marker Assisted Plant Breeding: Current Status and their Applications in Agricultural Development. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, 2017.

ALMEIDA, M.C.; GOMES, C.M., NASCIMENTO, L.F. (2014). Spatial distribution of deaths due to Alzheimer's disease in the state of São Paulo, Brazil. *São Paulo Medical Journal*, 132, 199-204. doi: 10.1590/1516-3180.2014.1324610.

ALVES, L. F., et al. Doença de Alzheimer: uma revisão sistemática da literatura. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano. 07, Ed. 05, Vol. 01, pp. 153-173. Maio de 2022.

ANDREASEN, N., et al. Cerebrospinal fluid tau and Abeta42 as predictors of development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett*, n.273(1), p.5-8, 1999.

APOLINÁRIO, D., et al. Doença de Alzheimer: Diagnóstico. Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar. Academia Brasileira de Neurologia; Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia; Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, 2011.

AVILA, R.; MIOTTO, E. Funções executivas no envelhecimento normal e na doença de Alzheimer. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. , v.52, p.53 - 62, 2003.

BARTUS, R. T.; EMERICH, D. F. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *JAMA*. 1999;282 (23):2208-9.

BEJANIN, A., et al. (2017). Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain* 140, 3286–3300. doi: 10.1093/brain/awx243.

BLENNOW, K; DE LEON, M. J; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. *Lancet.*, n.368 (9533), p.387-403, 2006.

BLOCK M. L.; ZECCA L., HONG J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8:57-69.

BOTTINO, C. M. C.; MORENO, M. D. P. (2006). Comprometimento cognitivo leve: critérios diagnósticos e validade clínica. Em C. M. C. Bottino, J. Laks & S. L. Blay (Orgs.). *Demência e transtornos cognitivos em idoso* (pp. 31-37). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

BRICKMAN, A. M., et al. Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. *Alzheimer's e Dementia. The Journal of the Alzheimer's Association*. 2021;17:1353–1364.

CARAMELLI, P., et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil - Exames complementares. *Dementia & Neuropsychologia*, 2011, 5(3),11-19.

CAVERS, S., et al. (2005). Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity*, 95(4), 281- 289.

CHIES, S. T. T., et al. (2014). O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae. *Ciência e Natura*, 36, 279-293.

COLASANTI, T., et al. Autoanticorpos em pacientes com doença de Alzheimer: papel patogênico e uso potencial como biomarcadores da progressão da doença. *Autoimmun Rev*. 2010; 9 :807–811.

COUTO, E. C.; COSTA, G. B.; SOUSA, L. B. I.; ALMEIDA, D. M. P. F. de. (2017). O uso atual da genética na prevenção, tratamento e cura de doenças. *Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde*. v.4. n-1., 47–56.

DEMARSHALL, C. A., et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Detection of Alzheimer's disease at mild cognitive impairment and disease progression using autoantibodies as blood-based biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2016. doi: 10.1016/j.dadm.2016.03.002.

DIAS-SALMAN, A. K.; GIACHETTO, P.F.; MALAGO, W. (2009) Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* 10, 1-16.

DUBOIS, B., et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *The Lancet Neurology*, 2010, 9(11),1118-1127.

EISENBERG A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: biomarcadores tumorais (revisão de literatura). *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2001, 47(4): 377-88.

FROTA, N. A. F., et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dementia & Neuropsychologia*, 2011, 5(3),6-10.

GALASKO, D., et al. Antemortem CSF tau is related to neuronal pathology at autopsy in Alzheimer's disease. *Soc Neurosci Abstr*, (21):581, 1995.

GIEHL, G. A biotecnologia e segurança dos alimentos transgênicos. *Revista Âmbito Jurídico*, v.3, n.5, 2006.

GIUNTA, B., et al. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2008;5:51.

GOEDERT, M.; CROWTHER R. A.; GARNER C. C. Molecular characterization of microtubuleassociated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci*, v. 14(5), p.193-9, 1991.

GROVER, A.; SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and presente. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, (36) 290-302.

GUTIERREZ, B. A. O.; SILVA, H. S.; GUIMARÃES, C.; CAMPINO, A. C. (2014). Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos? *Ciência & Saúde Coletiva*, 19, 4479- 4486. doi:10.1590/1413-812320141911.03562013.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.

HEBERT, L. E., et al. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of neurology*, 60(8), 1119–1122.

HERRERA, E. J., et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2002;16:103-108.

IBACH, B., et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid in Alzheimer patients, disease controls and an age-matched random sample. *Neurobiol Aging*. 2006 Sep;27(9):1202-11. Epub 2005 Aug 8.

ISHIGURO K., et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, v. 270(2), p.91-4, 1999.

ITO, N., et al. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, v.50, p.150–156, 2001.
JOHNSON, K. A., et al. (2015). Tau PET imaging in aging and early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol*. 79, 110–119. doi: 10.1002/ana.24546.

JIN, J. Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 2015; 313 (14): 1488. Disponível em:<<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2247146>>. Acesso em 20 de Novembro de 2022.

KURZ, A., et al. Tau protein in cerebrospinal fluid is significantly increased at the earliest clinical stage of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, v.12(4), p.372-7, 1998.

LIMA, N.; MOTA, M. Biotecnologia: fundamentos e aplicações. Portugal: Lidel, 2003.

LIMA, J. M., et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol.* 43 (1). 2006.

MATTOS, C. M. Z. et al. Processo de enfermagem aplicado a idosos com Alzheimer que participam do projeto estratégias de reabilitação. *Estudo Interdisciplinar Envelhecimento*. Porto Alegre, v. 16, edição especial, p. 433-447, 2011.

MATTSSON, N., et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA*. 2009;302(4):385-93

MCKHANN, G., et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34:939-944.

OKAMURA, N.; YANAI, K. (2017). Brain imaging: applications of tau PET imaging. *Nat. Rev. Neurol.* 13, 197–198. doi: 10.1038/nrneurol.2017.38.

RAY, S., et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 2007;13(11):1359-1362. doi:10.1038/nm1653.

RIBEIRO, H. F.; DOS SANTOS, J. S. F; DE SOUZA, J. N. Doença de Alzheimer de início precoce (DAIP): características neuropatológicas e variantes genéticas associadas. *Rev Neuropsiquiatr*, Lima , v. 84, n. 2, p. 113-127, abr. 2021.

SAADAUI, E., et al. (2017). Castor bean (*Ricinus communis* L.): Diversity, seed oil and uses. *Oil Seed Crops: Yield and Adaptations under Environmental Stress*, 19 - 33.

SCHNEIDER, P.; HAMPEL, H.; BUERGER, K. Candidatos a marcadores biológicos da doença de Alzheimer no sangue, plasma e soro. *CNS Neurosci Ther.* 2009; 15 :358–374.

SCRIBAN, R. Biotecnologia. S. Paulo: Manole, 1985.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001;81(2):741- 66.

SJOGREN, M., et al. The cerebrospinal fluid levels of tau, growth associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dement Geriatr Cogn Disord*, v.12(4), p.257-64, 2001.

SILVA, J. G. F.; SIQUEIRA, M. A. REVISÃO SOBRE A DOENÇA DE ALZHEIMER: DIAGNÓSTICO, EVOLUÇÃO E CUIDADOS *Psicologia, Saúde e Doenças*, vol. 18, núm. 1, 2017, pp. 131-139. Sociedade Portuguesa de Psicologia da Saúde Lisboa, Portugal.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. *Brazilian Journal of Psychiatry* [online]. 1999, v. 21.

SOARES, H. D., et al. Plasma Biomarkers Associated With the Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 2012;69(10):1310–1317.

SUNDERLAND, T., et al. (2003). Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, 289(16), 2094–2103.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J Clin Neurosci.* 2004;11(5):456-67.

PINTO, M. C. X. Introdução ao Sistema Nervosa Autônomo. UFG. 2017. Disponível em <<https://pt.slideshare.net/MauroCunhaXavierPint/aula-sna-introduo-ao-sistema-nervoso-autnomo>> Acesso em: 20 de Novembro de 2022.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (2017). Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. Sociedade Brasileira de Genética.

VANMECHELEN, E., et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett*, v.285(1), p.49-52, 2000.

WANG, J. Z., et al. Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanism of Neurofibrillary Degeneration. *J Alzheimers*. 2013.

WESS, J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci*. 1993;14(8):308-13.